

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CAMPUS CURITIBANOS**  
**BACHARELADO EM CIÊNCIAS RURAIS**

**MARCIELLY FLECK TURATTO**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO FUNGO NEMATÓFAGO *Trichoderma* spp NO  
CONTROLE DO *Meloidogyne incognita* NA CULTURA DA SOJA**

**CURITIBANOS**

**2013**

**MARCIELLY FLECK TURATTO**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO FUNGO NEMATÓFAGO *Trichoderma* sp., NO  
CONTROLE DO *Meloidogyne incognita* NA CULTURA DA SOJA**

Projeto de conclusão submetido à disciplina de projetos de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina- Campus Curitibanos para a obtenção do Grau de Bacharel em Ciências Rurais. Orientadora: Glória Botelho. Co-orientadores: Alexandre Tavela e Mônica Santos.

**CURITIBANOS-SC**

**2013**

## RESUMO

A Soja (*Glycine max* Merr), é atualmente a leguminosa com maior importância no mercado mundial, sendo o Brasil o segundo maior produtor do mundo. Porém o potencial produtivo se limita em grande parte pelo número de patógenos presentes na cultura, e entre esses patógenos os fitonematoides do gênero *Meloidogyne* são responsáveis por uma representativa queda na produção. O *M. incognita*, é considerada a espécie mais danosa para a cultura da soja no gênero *Meloidogyne*, devido a sua alta taxa de reprodução, ampla distribuição e gama de hospedeiros. O principal sintoma causado pelo *M. incognita*, é a formação de galhas, que resultam de hiperplasia e hipertrofia celular no cilindro vascular, e no parênquima cortical, impedindo a absorção de água pela planta. Atualmente o principal método de controle de nematoides é feito por produtos químicos, que são altamente tóxicos. Com vista nesse problema tem-se o objetivo de avaliar *in vitro* o potencial antagônico de diferentes isolados fúngicos de *Trichoderma* sp., em diferentes condições de temperatura, pH, e quantidades de suspensões de *M. incognita*, sobre os fitonematoides formadores de galhas. Espera-se que os fungos apresentem potencial antagônico representativo nas diferentes condições propostas, visto que uma vez implantado a campo os fungos enfrentarão diferentes condições de temperatura, pH, e populações de nematoides.

**Palavras chaves:** *Glycine max* Merr, *Meloidogyne incognita*, *Trichoderma* sp., controle biológico, avaliação *in vitro*.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	5
2. JUSTIFICATIVA .....	7
3. HIPÓTESE.....	7
4. OBJETIVO .....	8
4.1. Objetivos específicos .....	8
5. REFERENCIAL TEÓRICO .....	9
5.1. Soja ( <i>Glycine max</i> Merr.) .....	9
5.2. Fitonematoides .....	9
5.3. <i>Meloidogyne incognita</i> .....	12
5.4. Ciclo de vida do <i>Meloidogyne incognita</i> .....	12
5.5. Sintomatologia <i>Meloidogyne incognita</i> .....	13
5.6. Controle Biológico.....	14
5.7. Fungos nematófagos .....	16
5.8. <i>Trichoderma</i> sp. ....	16
6. METODOLOGIA .....	19
6.1. Amostragem <i>Meloidogyne incognita</i> .....	19
6.2. Extração de nematoides de amostras de solo. ....	20
6.3. Extração de nematoides de amostras de raízes. ....	20
6.4. Contagem dos fitonematoides .....	21
6.5. Isolados de <i>Trichoderma</i> sp .....	21
6.6. Avaliação do antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> sp., em <i>M. incognita</i> . ....	21
6.7. Efeito da temperatura no antagonismo do <i>Trichoderma</i> sp em fitonematoides <i>M. incognita</i> .....	22
6.8. Efeito do pH no antagonismo do <i>Trichoderma</i> sp em fitonematoides <i>M. incognita</i> .....	22
6.9. Avaliação do potencial do fungo nematófago <i>Trichoderma</i> sp., em diferentes concentrações de <i>M. incognita</i> . ....	23
6.10. Análise estatística .....	23
7. RESULTADOS ESPERADOS .....	24
7.1. Avaliação do antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> sp., sobre <i>M. incognita</i> . ....	24
7.2. Efeito do pH no antagonismo do <i>Trichoderma</i> sp., em fitonematoides <i>M. incognita</i> . ....	24
7.3. Avaliar o potencial antagonista do fungo nematófago <i>Trichoderma</i> sp em diferentes concentrações de <i>M. incognita</i> . ....	24

7.4. Testar a eficácia em diferentes temperaturas, do potencial antagonista do fungo <i>Trichoderma</i> sp. ....	24
8. CRONOGRAMA.....	25
9. ORÇAMENTO .....	26
10. REFERÊNCIAS .....	27

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, ficando apenas atrás dos EUA. Esse quadro poderia ser melhor se não houvesse tantas perdas com fatores bióticos. Dentre esses fatores os nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp) apresentaram perdas estimadas de 237 mil toneladas de soja no ano de 2000 (SILVA et al., 2002).

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* spp, são os fitonematoides que mais causam danos na cultura da soja (KIMARI et al., 1997). Devido ao monocultivo da soja, ou rotação com espécies de plantas que também são hospedeiras, aliado com a baixa cobertura do solo, os fitonematoides como os do gênero *Meloidogyne* encontram um ambiente propício para seu desenvolvimento, onde há nutrientes necessários para seu desenvolvimento, aliado com a baixa massa microbiana no solo, descartando assim a possibilidade de possíveis competidores no ambiente.

Dentre as espécies *Meloidogynes* na cultura da soja, o *M. javanica* e *M. incognita* se apresentam como os mais agressivos. Isso se deve graças a sua alta taxa de reprodução, ampla gama de hospedeiros e vasta distribuição geográfica. (KIMARI et al., 1997).

As principais alterações causadas por esses nematoides podem ser observadas no sistema radicular das plantas atacadas (SOARES, 2006). Essas lesões diretas são representado em forma de galhas, ou seja, células hipertrofiadas que, interrompem os vasos do sistema radicular das plantas atacadas, causando deficiência nas raízes, conseqüentemente diminuindo a absorção de água e nutrientes, culminando em deficiência mineral na planta, menor crescimento aéreo e comprometendo a produção (NUNES, 2008).

O controle dos fitonematoides pode ser feito através de diversos métodos como: Através de rotação de cultura, escolha de variedade resistente, escolha correta da época de plantio, incorporação de matéria orgânica; controle físico com esterilização do solo através de calor úmido; controle químico através de nematicidas fumigantes ou sistêmicos; e por fim através de controle biológico com a utilização de bactérias, nematoides, vírus ou fungos (KIMARI et al., 1997)

Para o controle de nematoides assim como outras doenças causadas em soja, geralmente se recorre ao controle químico, nesse caso os nematicidas. Os nematicidas apresentam alta toxicidade, risco de contaminação ambiental, alto custo, e baixa eficácia após repetidas aplicações Dong e Hang (2006 apud NUNES, 2008).

Em virtude dos possíveis impactos negativos que os nematicidas podem provocar (MICHEREFF,2001) e as restrições de uso desses produtos, o controle biológico pode se tornar um grande aliado em grandes produções (SANTOS; SOARES; BARBOSA, 2013).

O controle biológico apresenta uma série de vantagens em relação ao químico, pois não contamina o ambiente, não deixa resíduos, não causa desequilíbrio em microrganismos benéficos do solo, pode transformar os solos contaminados em supressivos, tem menor custo, fácil aplicação e não favorece o surgimento de espécies resistentes (SOARES, 2006; NUNES, 2008).

No controle biológico de fitonematoides os fungos são representados como os principais agentes antagonistas. Esses podem parasitar ovos, predaar juvenis, adultos ou cistos, ou produzirem enzimas degradadoras, tóxicas ou antibióticas (NUNES,2008). Os fungos do gênero *Trichoderma* sp., possuem alta adaptabilidade, velocidade de reprodução e agressividade o que são características essenciais para ser um integrante antagonista no controle biológico (SILVA; MELLO, 2007).

A avaliação *in vitro* do potencial antagonista do *Trichoderma* sp., permite avaliar de forma preliminar o tempo, temperatura ótima para desenvolvimento, pH ideal, tipo de antagonismo e eficiência do fungo, em tempo reduzido e eficácia para posterior implantação a campo.

## 2. JUSTIFICATIVA

Atualmente o controle dos fitonematoides é feito através do uso de agrotóxicos, os nematicidas, esses por sua vez são produtos caros, apresentam alto grau de resíduo, alta toxicidade tanto para quem aplica, ao meio ambiente e a microrganismos presentes no solo (TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2010), diminuindo a supressividade do solo.

Por outro lado a busca por alimentos livres de agrotóxicos, e a crescente preocupação com contaminações ambientais, estão despertando cada vez mais o interesse dos consumidores em saber qual a procedência do alimento a ser consumido.

Outras práticas como rotação de culturas, podem se tornar ineficientes em alguns casos, devido a ampla gama de hospedeiros que alguns nematoides como os do gênero *Meloidogyne* sp., possuem ou economicamente inviável ao produtor devido ao fato que as culturas antagonistas geralmente não possuem valor econômico, ou apresentarem ineficiência a curto prazo (TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2010).

Em virtude desses problemas o controle biológico pode se tornar um grande aliado para os pequenos e grandes produtores, não reduzindo sua produção, não tendo preocupações com possíveis intoxicações, contaminações, e podendo agregar valor ao seu produto no qual não haverá ou diminuirá o uso de produtos químicos.

## 3. HIPÓTESE

Diferentes isolados fúngicos do gênero *Trichoderma* sp., apresentem potencial antagonico *in vitro* contra suspensões de *Meloidogyne incognita*, em diferentes condições ambientais controladas em laboratório.



#### **4. OBJETIVO**

Avaliar *in vitro* o fungo nematófago *Trichoderma* sp., no controle de fitonematoides formadores de galhas *Meloidogyne incognita*.

##### **4.1.Objetivos específicos**

Avaliar o potencial antagonista do gênero *Trichoderma* sp., no controle dos fitoparasitas *M. incognita*.

Avaliar o potencial antagonista do fungo nematófago *Trichoderma* sp., em diferentes concentrações de *M. incognita*.

Testar a eficácia em diferentes temperaturas, do potencial antagonista do fungo *Trichoderma* sp.

Testar o potencial antagônico do fungo *Trichoderma* sp., em diferentes condições de pH.

## 5. REFERENCIAL TEÓRICO

### 5.1. Soja (*Glycine max* Merr.)

A soja (*Glycine max* Merr.) pertence à família Fabaceae e é a mais importante entre as leguminosas produtoras de grãos do mundo, tanto em termos de produção quanto de comércio (LANGE, 2008).

Na área dos agronegócios a soja, está entre as atividades que apresentaram maior crescimento nas últimas décadas (DALLAGNOL; LAZAROTTO; HIRAKUR, 2008). O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, ficando apenas atrás dos Estados Unidos. Na safra 2010/2011 o Brasil produziu 75,0 milhões de toneladas do grão em 24,2 milhões de hectares, obtendo assim uma produtividade de 3.106 Kg/ha, o EUA produziu 90,6 milhões de toneladas em 31,0 milhões de hectares, obtendo uma produção de 2.922 Kg/há (AMAZONAS, 2012).

O Departamento de agricultura dos Estados Unidos (USLA), estima que na safra 2013/2014 o Brasil lidere a ranking de maior produtor mundial de soja, obtendo uma produção de 88 milhões de toneladas, enquanto os EUA produzirá em torno de 85,7 milhões de toneladas (FIESP, 2013).

Por outro lado um dos fatores que limita a produção de soja no Brasil são as doenças. Estima-se que 10 milhões de toneladas de soja seja perdida devido a fatores bióticos e abióticos Conab, 2005 apud (MORALES, 2008). Dentre os fatores bióticos os nematoides apresentam prejuízos expressivos na cultura da soja, sendo que os *Meloidogynes* formadores de galhas apresentaram um prejuízo estimado de 237 mil toneladas de soja no ano de 2000 (SILVA et al., 2002).

### 5.2. Fitonematoides

De acordo com Amorim; Rezende; Bergamin Filho (2011) os nematoides são organismos tubulares, alongados, e de diâmetro praticamente constante ao longo do comprimento do corpo. Nos fitonematoides é onde ocorre a maior variação na forma do corpo, podendo ser vermiforme, em forma de pêra (*meloydogena*), de limão (*Heterodera*), de rim (*Rotylenchulus*), entre outros. Os machos são sempre mais esguios e alongados. Quanto maior o diâmetro do corpo do fitonematoides, mais sedentário esse será, isto é incapaz de se locomover no tecido da planta hospedeira.

Os nematoides são essencialmente organismos aquáticos, podendo ser encontrados no mares, oceanos, água doce e na porção de água do solo (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

O tamanho dos nematoides pode variar sendo que, os fitoparasitas medem normalmente de 1-2 mm de comprimento e 20-50  $\mu$ m de diâmetro (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). Em geral esses organismos são incolores ou translúcidos, o que ajuda na hora da identificação dos mesmos através da visualização de suas estruturas internas (SANTOS; SOARES; BARBOSA, 2013). Nos nematoides não existe sistema circulatório e respiratório, porém a maioria apresenta sistema digestivo completo, reprodutivo, excretório, nervoso e uma grande gama de músculos (TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2010).

Os nematoides geralmente são dióicos, sendo que o aparelho reprodutor feminino é composto por ovário, oviduto, útero, e vagina (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). As fêmeas podem ser classificadas em monodelficas; quando possuem somente um ovário e didelficas quando possuem dois ovários (MICHEREFF, 2001).

O aparelho reprodutor do macho é composto por testículo, vesícula seminal, vaso deferente, glândulas ejaculadoras, canal ejaculador, e cloaca. Na cloaca estão os órgãos de copula, que são espícula, gubernáculo, bursa e papilas genitais (MICHEREFF, 2001).

A maioria dos fitonematoides é ovípara, ou seja, o desenvolvimento embriogênico ocorre após a postura, fora do corpo do nematoide. Alguns são ovovivíparos, onde os ovos ainda no interior do útero já possuem juvenis formados (MICHEREFF, 2001) (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

Os nematoides tem a capacidade de passar por um estado de dormência ou inatividade, onde seu metabolismo se mantém muito baixo, permitindo assim a sobrevivência por um longo período de tempo sob condições adversas como falta de oxigênio, alimento, ou temperaturas baixas (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). Um grande exemplo são os fitonematoides do gênero *Heterodera*, onde os ovos permanecem dentro das fêmeas e estes se revestem por uma resistente cutícula denominada de coriácea, que permite a sobrevivência desses ovos e impede a ação de nematicidas (MICHEREFF, 2001). Há relatos em que o nematoide *Anguina tritici*, pode se conservar vivo por um período superior a 35 anos no interior das galhas das sementes (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

Existem nematoides de diferentes hábitos alimentares como os bacteriófagos, os micófagos que são aqueles que se alimentam de fungos, os protozóofagos, algívoros, oligoquetófagos, nematófagos e por fim os fitoparasitas ou fitonematoides que se alimentam de plantas superiores (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). O grupos de

nematoides mais abundantes são os fitófagos e os bacteriófagos (SANTOS; SOARES; BARBOSA, 2013).

Os fitonematoides são caracterizados pela presença do estilete. Essa estrutura oca penetra na célula da planta através de movimentos de protração e retração sugando e introduzindo material enzimático na célula vegetal (SANTOS; SOARES; BARBOSA, 2013). Todos os fitonematoides são denominados de parasitas obrigatórios, ou seja, as plantas infectadas raramente morrem (ALMEIDA, 2008).

Os fitonematoides podem ser divididos em parasitas de partes aéreas ou seja aqueles que se alimentam das partes das plantas que estão acima do solo como folhas, caules, e os fitonematoides de raízes e tubérculos que são aqueles que se alimentam das partes das plantas que estão abaixo do solo (COYNE; NICOL; CLAUDIUS-COLE, 2007). Os nematoides podem agir de diferentes modos sobre a planta hospedeira, podendo esta ação ser traumática, quando são causadas injúrias mecânicas na planta, espoliadoras quando ocorre o desvio de nutrientes da planta para o nematoide. E tóxica quando o nematoide secreta toxinas ou enzimas produzidas por glândulas esofagianas ou salivares que são prejudiciais as plantas (MICHEREFF, 2001).

Esses organismos também podem ser subdivididos quanto ao seu hábito de parasitismo e mobilidade. Os endoparasitas migratórios são aqueles nematoides que migram e se alimentam no interior dos tecidos da planta. Os endoparasitas sedentários são aqueles que se encontram em sua totalidade no interior da planta e ficam imóveis em apenas um local para se alimentarem. Os ectoparasitas são nematoides que se mantêm no exterior da planta (COYNE; NICOL; CLAUDIUS-COLE, 2007).

São encontrados nematoides parasitas de plantas nas duas classes do filo Nematoda: Choromadorea e Enoplea. Na classe Choromadorea, é onde se concentra os fitonematoides de maior interesse agrícola em especial na família Rhadabditida, afunilando para a subordem Tylenchina. Nesta estão descritos os nematoides que parasitam principalmente as raízes. Na superfamília Tylenchoidea encontramos nematoides das famílias Meloidogynidae (Skarbilov), Pratylenchidae (Thorne), Hoplolaimidae (Filipjev), Dolichodoridae (Chitwood) (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

Os gêneros de maior importância no Brasil são aqueles pertencentes a subordem Tylenchina, onde são encontrados em grande escala e causam diversos danos em diferentes culturas. As principais são os integrantes dos gêneros *Meloidogyne* Goeldi, *Pratylenchus* Filipjev, *Tylenchulus* Cobb, *Rotylenchulus* Linford e Oliveira, e *Heterodera* Schmidt (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

O número de nematoides parasitas de plantas estimado no Brasil é de 238 espécies, sendo os do gênero *Meloidogyne* (Goeldi) o mais danoso para as produções agrícolas, devido a alta capacidade de adaptação desses parasitas em diversas culturas (ALMEIDA, 2008).

### **5.3. *Meloidogyne incognita***

As espécies de *Meloidogynes* que mais causam danos na cultura da soja são: *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica* (KIMARI et al., 1997). O *M. incognita* é considerada uma das espécies com maior potencial danoso as culturas, chegando a aproximadamente 95% dos danos causados por fitonematoides na agricultura mundial (Moura, 1996 apud SANTOS, 2012).

A reprodução do *M. incognita* é dada através de partenogênese mitótica. As populações dessa espécie apresentam rápida colonização e adaptação a diferentes ambientes, isso confere o alto grau de agressividade dessa espécie, sendo considerada uma das mais destrutivas do mundo Trudgill e Blok (2001 apud SANTOS, 2012).

O conhecimento da espécie de *Meloidogyne* é de extrema importância para o emprego da técnica mais eficiente de controle (KIMARI et al., 1997). Possuindo grande importância devido aos danos que esses nematoides causam, ao grande número de plantas hospedeiras e ampla distribuição geográfica.

Dentre os métodos empregados na identificação de espécies do gênero *Meloidogyne*, destacam-se configuração perineal das fêmeas, morfologia da região anterior e do estilete de macho e fêmeas, fêmeas e juvenis de segundo estágio ( $J_2$ ), características criptogenéticas e identificação bioquímica e molecular Eisenback e Hunt (2009 apud SANTOS, 2012). A utilização de técnicas como a eletroforese vem sendo bem empregadas, evitando assim possíveis erros na identificação (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001).

### **5.4. Ciclo de vida do *Meloidogyne incognita***

Durante o ciclo de vida do *Meloidogyne incognita*, ocorrem quatro ecdises. A primeira ( $J_1$ ) ocorre no interior do ovo, logo em seguida o ovo eclode e da origem a um juvenil de segundo estágio ( $J_2$ ). Esses juvenis são vermiformes e móveis, denominados pré-parasitas ou infestantes (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). Os  $J_2$  eclodem dos ovos através de força mecânica exercida pelo estilete e pela ação enzimática de quitinases, produzidas por glândulas esofagianas e liberada pelo estilete (SANTOS, 2012). Ao eclodirem os juvenis  $J_2$ , são guiados em direção as raízes, graças aos exsudatos radiculares que são

liberados pela planta (SANTOS, 2012). Penetrando na raiz da planta esse nematoide migra até seu sitio de alimentação no interior da planta hospedeira e munidos de materiais enzimáticos degradadoras de parede celular, conseguem estabelecer um sitio de alimentação, formando assim células gigantes, também conhecidas como galhas (SANTOS, 2012). Essas células gigantes estão localizadas na extremidade anterior do seu corpo, são células hipertrofiadas, com citoplasma denso, granuloso e núcleo evidente, e são essenciais ao desenvolvimento do nematoide (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

Com a formação das células gigantes, ou nutridoras o Juvenil ( $J_2$ ) tende a se tornar mais sedentário, perdendo a mobilidade (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). No sitio de alimentação o nematoides sofre mais duas ecdises passando de  $J_2$  para  $J_3$  e  $J_3$  para  $J_4$  (SANTOS, 2012).

Nematoides causadores de galhas possuem dimorfismo sexual. As fêmeas tornam-se alongadas e esféricas, enquanto o macho muda para um formato vermiforme e migram da raiz (TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2010). Sob condições de estresse, os juvenis fêmeas podem sofrer reversão sexual e acabam se transformando em machos (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

A fêmea da espécie *M. incognita* possui o corpo em forma de globo com a região anterior formando um pescoço, por onde deposita os ovos, formando assim um aglomerado na raiz da planta hospedada. Ao depositar os ovos a fêmea secreta substancias gelatinosas através do ânus, que possuem a função de fixação e união desses ovos. Essa massa de ovos pode ficar no parênquima cortical, ou seja na parte interna da planta, ou sobre a superfície das raízes (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). A fêmea é capaz de produzir uma massa de ovos de 300-500 ovos e seu ciclo de vida é relativamente curto durando de 21-50 dias (TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2010).

O ciclo biológico desses nematoides é muito influenciado por fatores ambientais como temperatura, umidade, e planta hospedeira, mas em geral esse ciclo se completa em 3-4 semanas, sendo a faixa ideal de temperatura de 25-30 °C para *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, e 15-25 °C para *M. hapla* Taylor e Sasser, 1978 apud (TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2010).

### **5.5. Sintomatologia *Meloidogyne incognita***

Dentre os sintomas causados pelo ataque dos *meloidogynes* podemos sub dividi-los em diretos, ou seja aqueles que são observados no órgão parasitado da planta e sintomas reflexos

aqueles que são observados em partes aéreas das plantas (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

Entre os sintomas diretos, o mais comum é a formação de galhas, que são resultados de hiperplasia e hipertrofia celular no cilindro vascular, e no parênquima cortical da planta. Essa alteração celular é formada pela própria planta em reação, as toxinas introduzidas pelos nematoides (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). As células hipertrofiadas funcionam como um funil, desviando o fluxo de nutrientes do floema, para a alimentação dos nematoides (TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2010).

As plantas infestadas pelo *M. incognita* geralmente apresentam baixo número de radicelas, o que dificulta a absorção de nutrientes e água do solo para a planta (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

Outros sintomas diretos que também são muito comuns são o descolamento cortical, raízes digitadas e rachaduras (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

Dentre os sintomas reflexos os que mais se destacam é a formação de reboleiras, devido a distribuição irregular dos nematoides, afetando o crescimento das plantas infestadas, deixando-as com tamanhos reduzidos, e depauperadas. Deficiências nutricionais, murcha devido ao desequilíbrio entre a tomada e perda de água, desfolha e diminuição de produção são também sintomas reflexos quando ocorre a infestação de *Meloidogyne incognita* (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

## **5.6. Controle Biológico**

“O controle biológico de doenças de plantas, é definido como a redução de inóculos ou das atividades determinantes da doença, realizada por um ou mais organismos que não o homem” conforme Cook e Baker, 1993 apud (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

Ao analisar essas definições concluímos que o controle biológico é um espaço onde encontramos, o patógeno, o hospedeiro e o antagonista, todos interagindo como se fosse em um sistema natural (MICHEREFF, 2001).

A importância de saber tudo sobre o patógeno, para o controle biológico é muito relevante pois sabendo hábitos como habitat, relação nutricional, preferência de ataque ao hospedeiro em relação ao estado vegetativo por exemplo nos dá uma ideia de como podemos utilizar o controle biológico a favor do hospedeiro. (TORRES; MICHEREFF, 2000).

O antagonista será o agente biológico que vai agir sobre o patógeno, e assume a importância no controle biológico em relação ao patógeno alvo (TORRES; MICHEREFF, 2000)

O hospedeiro exerce uma ação direta no controle biológico quando permite a ação do antagonista sobre o patógeno. Também pode adquirir resistência geral e genética. (TORRES; MICHEREFF, 2000).

Segundo Michereff, (2001) antagonismo pode ser definido como “interação entre organismos, na qual um ou mais metabólitos produzidos pelo antagonista têm efeito negativo sobre o fitopatógeno, resultando na inibição do crescimento e/ou germinação”. Esses mecanismos de ação também são chamados de antibióticos. Espécies do fungo do gênero *Trichoderma* por exemplo são capazes de secretar 100 diferentes tipos de antibióticos (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

Competição se define pela interação de dois organismos disputando o mesmo espaço, em busca de alimento, como carboidratos, nitrogênio, ferro, e fatores de crescimento (TORRES; MICHEREFF, 2000). No controle biológico o resultado esperado é que o agente antagonista se desenvolva de melhor forma que o patógeno, para que o uso desse organismo seja eficiente (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). O competidor bem sucedido é aquele que possui uma alta taxa de reprodução ou que é mais eficiente na obtenção do nutriente a ser disputado (TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2010).

Parasitismo ocorre quando um organismo se alimenta do outro (TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2010). O Parasitismo pode ocorrer em estruturas reprodutivas, vegetativas e de sobrevivência do patógeno, reduzindo assim a vida e a propagação do mesmo (MICHEREFF, 2001). Em fungos ocorre o micoparasitismo, que é subdividido em necrotrófico e biotrófico. O necrotrófico é quando o fungo não infecta o hospedeiro, atuando somente através de enzimas e substâncias tóxicas. O biotrófico elimina o hospedeiro adquirindo nutrientes diretamente das células vivas, isso ocorre através do contato, penetração e crescimento no hospedeiro (TORRES; MICHEREFF, 2000).

A indução de resistência se refere à ativação de mecanismos de resistência da planta através de agentes bióticos ou abióticos (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). Dentre os mecanismos de resistência apresentados após a indução pela planta estão proteínas, ligninas, barreiras histológicas e sinais como etileno, ácido jasmônico, ácido salicílico, jasminatos entre outros (TORRES; MICHEREFF, 2000). A inoculação de *Trichoderma harzanium* em plântulas de pepino são capazes de induzir resistência contra patógenos,



aumentando a atividade de enzimas degradadoras de fungos tanto nas raízes quanto na parte aérea da planta (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

### **5.7. Fungos nematófagos**

Organismos como fungos, bactérias, ácaros, e outros nematoides podem ser considerados inimigos naturais de fitonematoídes, dentre esses inimigos os fungos tem se destacado como agentes controladores mais eficazes (SOARES, 2006).

Segundo Trigiano; Windham; Windham (2010), os fungos são organismos absorptivos, eucarióticos, heterotróficos, e com paredes celulares. Os fungos nematófagos são aqueles que atacam os nematoides, usando-os como fonte de nutrientes Soares (2006 apud MANKAU, 1980).

Cerca de 70 gêneros e 160 espécies de fungos com características nematófagos são conhecidos, constituindo assim o grupo de inimigos de nematoides mais estudado (FERRAZ et al., 2001). Esses agentes antagonistas podem agir de formas variadas no fitonematoídes, podendo ser predadores, endoparasitas, ectoparasitas, oportunistas ou produzir metabolitos tóxicos. (COIMBRA et al., 2005).

Os fungos nematófagos possuem a habilidade de desenvolver um sistema de hifas, para capturar os nematoides, imobilizando-os, penetrando e consumindo-os (ALMEIDA, 2008). Esses fungos possuem a capacidade de produzir estruturas armadilhas como anéis constritores, esporos adesivos, géis para captura, e ainda liberar toxinas para imobilizar esses fitonematoídes Almeida (2008 apud KERRY, 2000).

No controle biológico os fungos nematófagos são importantes agentes antagonistas, sendo as espécies *Trichoderma* e *Gliocladium*, as mais estudadas em condições de laboratório, casa de vegetação e campo (TORRES; MICHEREFF, 2000).

### **5.8. *Trichoderma* sp.**

Dos fungos com potencial antagonico o *Trichoderma* sp é o mais estudado para o controle biológico. Os fungos do gênero *Trichoderma* são filamentosos, presentes em todos os tipos de solo e em outros ambientes como a rizosfera, e matéria orgânica (SILVA; MELLO, 2007).

Graças a sua alta adaptabilidade em diferentes ambientes, capacidade metabólica, e sua agressiva competitividade na natureza o gênero *Trichoderma* exerce papel fundamental antagonista contra diversos microrganismos no solo (VAZ, 2010).

O gênero *Trichoderma* é uma fase anamórfica do gênero *Hypocrea*, pertence à classe dos fungos mitospóricos, subclasse Hifomicetos, ordem Moniliales, família Moniliaceae Samuel (1996 apud SANTIM, 2008). A maior parte das estirpes de *Trichoderma* têm sido associadas a um estado assexuado, com reprodução mitóticas (VAZ, 2010). A taxonomia, a genética e a composição da população de *Trichoderma* sp não estão totalmente compreendidas, necessitando assim de métodos mais precisos para caracterização do gênero (PERES; MELO, 1995).

Em meio de cultura o *Trichoderma* sp cresce rapidamente, adquirindo coloração esverdeada. Inicialmente a colônia possui superfície lisa e translúcida, tornando-se flocosa com o tempo (SANTIN, 2008). O gênero *Trichoderma* possui a habilidade de produzir clamidósporos, que são estruturas de resistência que se formam nos extremos das hifas VAZ (2010) apud (Grondona *et al.*, 1997). A temperatura ideal para o bom desenvolvimento do fungo é de 25°C Hjeljord *et al*, 2001 apud (SILVA; MELLO, 2007), podendo ser termo sensíveis a temperaturas acima de 35°C (VAZ, 2010).

“*Trichoderma hamatum* destaca-se por ser a espécie mais estudada do ponto de vista do controle biológico, embora outras espécies como *T. koningii*, *T. viride*, *T. pseudokoningii* e *T. polysporum* também tenham sido isoladas e testadas” (TORRES; MICHEREFF, 2000).

O controle biológico com esses fungos se dá por diferentes fatores: mecanismo de defesa, produção de antibióticos, competição por espaço ou nutrientes, micoparasitismo (VAZ, 2010). Os principais mecanismos de ataque são: parasitismo, antibiose e competição (TORRES; MICHEREFF, 2000).

Os fungos do gênero *Trichoderma* sp. Possuem a capacidade de degradar a parede celular dos fitopatógenos, através de enzimas produzidas em seu organismo, como amilases, proteases e lipases Chérif & Benhamou (1990 apud VAZ, 2010).

A antibiose de muitas espécies de *Trichoderma* vem sendo expressas, devido a metabólitos secundários, voláteis e não voláteis, que são representados pela produção de diferentes tipos de antibióticos. A competição por espaço ou nutrientes se deve a alta agressividade desse gênero, impedindo a propagação de outros microrganismos, através de rápido crescimento e colonização. O micoparasitismo é o principal modo de ação do gênero *Trichoderma*, onde o fungo usa o fitoparasita predado para alimentação. No micoparasitismo o *Trichoderma* sp cresce em direção ao fitopatógeno, se enrolando no alvo e degradando a parede

celular através de enzimas, impedindo assim o crescimento do fitopatógeno predado. Para cada fitopatógeno o *Trichoderma* é capaz de produzir diferentes enzimas com diferentes modos de ação (SILVA; MELLO, 2007).

No controle biológico de fitopatógenos, os fungos do gênero *Trichoderma* sp. tem apresentado grande eficácia, até mesmo contra aqueles que possuem mecanismos de resistência (TORRES; MICHEREFF, 2000). O uso de *Trichodermas* também pode ser eficaz no controle de fitonematoides de raízes como o *Meloidogyne javanica* Sharon *et al*, 2001 apud (SILVA; MELLO, 2007).

## 6. METODOLOGIA

Os procedimentos e avaliações *in vitro* serão conduzidos no laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina, campus Curitibanos. As coletas das amostras de solo e de raízes serão realizadas na cidade de Toledo-PR.

### 6.1. Amostragem *Meloidogyne incognita*.

A distribuição dos nematoides dificilmente é uniforme a campo (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011), devido a esse fator serão realizado quatro coletas sendo, duas amostras de material vegetal e duas amostras de solo. Duas amostras (raízes e solo) nas áreas aparentemente com maiores danos (reboleiras), e duas (raízes e solo) em áreas onde o dano não é aparente.

O local da amostragem será realizada em uma propriedade na cidade de Toledo-PR, onde o diagnóstico já foi previamente constatadas através de análises laboratoriais.

Para uma área de 1,0-2,0 ha serão coletadas de 20-30 sub amostras Baker (1985 apud GOULART, 2009) para cada parâmetro a ser analisado (áreas com reboleiras, e áreas sem reboleira). Para representar cada amostra o material será homogeneizado para se obter uma amostra composta.

O padrão de amostragem será realizada de maneira estratificada e sistemática(GOULART, 2009). A gleba será dividida em estratos. Em estratos de reboleiras, a coleta será realizada de forma que plantas e solos de toda a área da reboleira seja coletada (meio e extremidades). Nos estratos formados por áreas sem reboleira a coleta será realizada em ziguezagues (figura.1) .

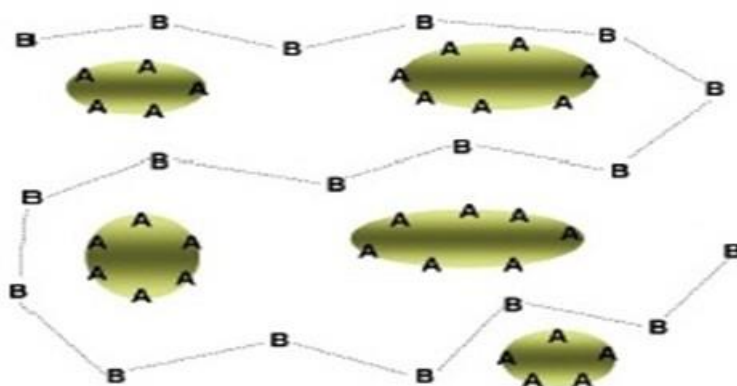
As coletas serão realizadas, a partir do florescimento da cultura da soja, devido aos fato de populações de nematoides decaírem em períodos de seca, ou serem menores em períodos de início de desenvolvimento da cultura (COYNE; NICOL; CLAUDIUS-COLE, 2007).

As amostras de solo, vão ser coletadas com auxílio de um trado. As sub amostras, serão coletadas a uma profundidade de 0-30 cm de profundidade de cada estrato, e serão acondicionadas em sacos plástico devidamente identificados.

Em amostras de raízes, cada amostra deverá conter aproximadamente 200g de raízes, preferencialmente as radículas, devido a preferência dos nematoides por essas áreas das raízes (GOULART, 2009). As amostras de raízes serão coletas de acordo com os estratos e nos mesmos locais onde foram coletadas as amostras de solo. As plantas deverão ser coletadas de

forma que ao tira-las do solo não se arranque-a pela parte aérea, para não ocorrer o quebraimento das raízes mais finas e essas fiquem no solo. Com o auxílio de uma pá, a planta será retirada do solo, logo em seguida as partes aéreas serão descartadas e o excesso de solo presente nas raízes deve ser retirado. As sub amostras de raízes serão acondicionada em sacos plásticos devidamente identificados.

Após a coleta, as amostras serão acondicionadas em caixas térmicas, afim de que condições ambientais não causem alterações nas mesmas (COYNE; NICOL; CLAUDIUS-COLE, 2007).



**Figura 1.** Coleta de sub amostras de solos e raízes em áreas com reboleiras (A), formando uma amostra composta; Coleta de sub amostras de solos e raízes em áreas aparentemente saudias (B), formando uma amostra composta. Fonte: GOULART, 2009.

## 6.2. Extração de nematoides de amostras de solo.

Na extração de nematoides em amostras do solo será aplicado o método de flotação centrífuga em solução de sacarose (JENKINS, 1964). Esse método consiste na separação por densidades através da centrifugação, onde o nematoide se separa da água na primeira etapa e posteriormente da solução de sacarose.

## 6.3. Extração de nematoides de amostras de raízes.

Na extração de nematoides em amostras de raízes será aplicado o método de Coolen e D'Here (1972), que se assemelha muito com o método de flotação centrífuga em solução de sacarose de Jenkins (1964). Onde os nematoides são separados por diferença de densidade.

#### 6.4. Contagem dos fitonematoides

Após a extração, os nematoides serão contados em placa de Peters. Esse trabalho consiste em percorrer os quadrados e contar os nematoides presentes na suspensão (GOULART, 2009). Após a contagem, as suspensões serão padronizadas em 100 nematoides/mL, esse valor será encontrado em uma amostra de 100 cm<sup>3</sup> de solo (ASMUS, 2003) (Tabela 1) e aproximadamente 12,5 g de raízes infectadas (GOULART, 2009). As suspensões serão misturadas e padronizadas de forma conjunta afim de formar uma única suspensão.

**TABELA 1. Nível de danos e índice de risco de espécies de *Meloidogyne* para a cultura da soja.**

Nematóide	Nível de danos (J <sub>2</sub> /100 cm <sup>3</sup> de solo)	Índice de risco* (%)
<i>M. javanica</i>	6-50	30-100
<i>M. incognita</i>	10-250	10-90
<i>M. arenaria</i>	6-70	30-100

\* 0 indica nenhum risco; 100 um alto (máximo) risco.  
Adaptado de Barker et al., 1985.

Fonte: (ASMUS, 2003).

#### 6.5. Isolados de *Trichoderma* sp

Cinco isolados (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>) de fungos *Trichoderma* sp serão cedidos pelo departamento de microbiologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos.

A manutenção do fungos ocorrerá em meio BDA (batata dextrose ágar), crescidos a 25-28 °C e armazenados a uma temperatura de 4°C, com repicagens periódicas para a manutenção dos isolados.

#### 6.6. Avaliação do antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* sp., em *M. incognita*.

Discos de 5 mm de diâmetro dos isolados fúngicos (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>) de *Trichoderma* sp., obtidos de cultivo puro em BDA, serão transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio ágar-água a 2%. A seguir será acrescentado 1 mL de uma suspensão concentrada contendo 100 nematoides de *M. incognita*.

A determinação do antagonismo vai ser avaliada após oito dias de incubação. As culturas serão incubadas em B.O.D. na ausência de luz e à temperatura de 25 °C. Seis discos

equidistantes de 9 mm de diâmetro serão retirados aleatoriamente em cada placa e colocados em sequência sobre lâminas para microscopia. Em microscópio óptico, sob aumento de 100 vezes, com auxílio de uma câmara de Peters serão realizadas as contagens dos fitonematoides que sofreram algum tipo de antagonismo pelos fungos, para que no final se obtenha uma média da porcentagem nematoides parasitados.

#### **6.7. Efeito da temperatura no antagonismo do *Trichoderma* sp em fitonematoides *M. incognita*.**

Discos de 5 mm de diâmetro dos isolados fúngicos (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>) de *Trichoderma* sp, obtidos de cultivo puro em BDA, serão transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio ágar-água a 2%. A seguir será acrescentado 1 mL de uma suspensão concentrada contendo 100 nematoides de *M. incognita*.

As culturas serão incubadas em B.O.D. na ausência de luz e à temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C.

A determinação do antagonismo vai ser avaliada após oito dias de incubação. Seis discos equidistantes de 9 mm de diâmetro serão retirados aleatoriamente em cada placa e colocados em sequência sobre lâminas para microscopia. Em microscópio óptico, sob aumento de 100 vezes, com auxílio de uma câmara de Peters serão realizadas as contagens dos fitonematoides que sofreram algum tipo de antagonismo pelos fungos, para que no final se obtenha uma média da porcentagem nematoides parasitados.

#### **6.8. Efeito do pH no antagonismo do *Trichoderma* sp em fitonematoides *M. incognita*.**

Discos de 5 mm de diâmetro dos isolados fúngicos (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>) de *Trichoderma* sp, obtidos de cultivo puro em BDA, serão transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio ágar-água a 2%. A seguir será acrescentado 1 mL de uma suspensão concentrada contendo 100 nematoides de *M. incognita*.

A determinação do antagonismo vai ser avaliada após oito dias de incubação sobre cinco diferentes valores de pH.

As culturas serão incubadas em B.O.D. na ausência de luz e à temperatura de 25 °C com pH de 4,0; 4,5; 5,0; 5,5;6,0. Serão incubadas seis placas para cada valor de pH.

A determinação do antagonismo vai ser avaliada após oito dias de incubação. Seis discos equidistantes de 9 mm de diâmetro serão retirados aleatoriamente de cada placa e colocados em sequência sobre lâminas para microscopia. Em microscópio óptico, sob aumento de 100 vezes,

com auxílio de uma câmara de Peters serão realizadas as contagens dos fitonematoides que sofreram algum tipo de antagonismo pelos fungos, para que no final se obtenha uma média da porcentagem nematoides parasitados.

#### **6.9. Avaliação do potencial do fungo nematófago *Trichoderma* sp., em diferentes concentrações de *M. incognita*.**

Discos de 5 mm de diâmetro dos isolados fúngicos (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>) de *Trichoderma* sp., obtidos de cultivo puro em BDA, serão transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio ágar-água a 2%. A seguir será acrescentado 1mL, 2mL, 3mL, 4mL e 5mL de uma suspensão concentrada contendo 100 nematoides/mL de *M. incognita*.

A determinação do antagonismo vai ser avaliada após oito dias de incubação. As culturas serão incubadas em B.O.D. na ausência de luz e à temperatura de 25 °C. Seis discos equidistantes de 9 mm de diâmetro serão retirados aleatoriamente em cada placa e colocados em sequência sobre lâminas para microscopia. Em microscópio óptico, sob aumento de 100 vezes, com auxílio de uma câmara de Peters serão realizadas as contagens dos fitonematoides que sofreram algum tipo de antagonismo pelos fungos, para que no final se obtenha uma média da porcentagem nematoides parasitados.

#### **6.10. Análise estatística**

As avaliações serão realizadas em delineamento inteiramente casualizado, onde as placas de petri serão as parcelas, com seis repetições para cada tratamento.

Os tratamentos utilizados nos experimento a ser analisados são: 5 espécies de *Trichoderma* (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>), temperatura (15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C), pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0), diferentes concentração de nematoides (1mL, 2mL, 3mL, 4mL e 5mL).

Serão realizadas análise de variância e o teste de comparação de médias quando a variável for qualitativa (espécies de *Trichoderma*), utilizando teste de Tukey a 5% de significância. E análise de regressão quando a variável for quantitativa (temperatura, pH, concentração de nematoides).



## **7. RESULTADOS ESPERADOS**

### **7.1. Avaliação do antagonismo in vitro de *Trichoderma* sp., sobre *M. incognita*.**

Espera-se que os quatro isolados fúngicos (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>) de *Trichoderma* sp., possuam potencial antagônico representativo contra os fitonematoides de *M. incognita*.

### **7.2. Efeito do pH no antagonismo do *Trichoderma* sp., em fitonematoides *M. incognita*.**

O desejável é que os quatro isolados fúngicos (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>), possuam potencial antagônico em todos os pH apresentados, devido a ampla faixa de pH presentes em diversos tipos de solos do Brasil.

Caso não seja possível o desenvolvimento do fungo em determinadas faixa de pH, deseja-se que seja definida uma faixa ideal para um bom desenvolvimento do potencial antagonista dos isolados.

### **7.3. Avaliar o potencial antagonista do fungo nematófago *Trichoderma* sp em diferentes concentrações de *M. incognita*.**

Na avaliação dos isolados fúngicos em relação a diferentes concentrações de nematoides, o desejável é que os fungos exerçam o mesmo potencial em todas as concentrações de nematoides, afim de avaliar o quanto os isolados fúngicos podem ser eficazes quando a população de nematoides é alta.

### **7.4. Testar a eficácia em diferentes temperaturas, do potencial antagonista do fungo *Trichoderma* sp.**

Sabendo- se que faixa ideal para o bom desenvolvimento do gênero *Trichoderma* sp., é de 25°C Hjeljord et al (2001 apud SILVA; MELLO, 2007), e apresentam termo sensibilidade a uma temperatura de 35°C (VAZ, 2010), deseja-se saber o percentual de antagonismo que os isolados irão apresentar nas cinco temperaturas apresentadas (15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C).

## 8. CRONOGRAMA

**Tabela 2.** Cronograma de Execução das Atividades

<b>ATIVIDADES</b>	<b>NOV/2013</b>	<b>DEZ/2013</b>	<b>JAN/2013</b>	<b>FEV/2013</b>	<b>MAR/2014</b>
<b>Contextualização do projeto</b>	X				
<b>Plantio da soja</b>		X			
<b>Amostragem</b>				X	
<b>Atividades laboratoriais</b>				X	
<b>Interpretação dos resultados</b>				X	
<b>Realização do relatório final</b>					X

## 9. ORÇAMENTO

MATERIAIS	QUANTIDADE	VALOR UNIDADE (R\$)	TOTAL (R\$)
<b>Centrífuga</b>	1 unidade	3200,00	3200,00
<b>Esteromicroscópio</b>	1 unidade	5500,00	5500,00
<b>Liquidificador</b>	1 unidade	701,00	701,00
<b>Câmara de Peters</b>	1 unidades	120,00	120,00
<b>Câmara Incubadora – Tipo B.O.D. - Modelo SP-500</b>	1 unidade	6000,00	6000,00
<b>Balança analítica</b>	1 unidade	2300,00	2300,00
<b>Placa de Petri</b>	2 cx com 100 un	630,00	1260,00
<b>Peagâmetro</b>	1 unidade	1000,00	1000,00
<b>Pipeta DIGIPET</b>	1 unidade	350,00	350,00
<b>Pisseta</b>	2 unidades	40,00	80,00
<b>Peneira 500 mesh</b>	1 unidade	244,00	244,00
<b>Peneira 20 mesh</b>	1 unidade	244,00	244,00
<b>Meio de cultura BDA</b>	1 Kg	250,00	250,00
<b>Meio de cultura agua-ágar 2%</b>	1 Kg	93,00	93,00
<b>Caolin</b>	1 Saco 30 Kg	25,00	25,00
<b>Luvas para procedimentos</b>	1 cx com 100 un	22,00	22,00
<b>Açúcar</b>	1 Kg	2,50	2,50
<b>Balde graduado litros</b>	1 unidade	22,00	22,00
<b>Semente soja</b>	1 Saco 25 kg	100,00	100,00
<b>Trado holandês</b>	1 unidade	270,00	270,00
<b>Caixa térmica 32 litros</b>	1 unidade	70,00	70,00
<b>Tesoura marca universal 17 cm</b>	1 unidade	15,00	15,00
<b>Pá</b>	1 unidade	28,00	28,00
<b>Embalagens plásticas Ziplock</b>	Embalagem com 40 un	40,00	40,00
<b>TOTAL</b>			<b>21.936,50</b>

## 10. REFERÊNCIAS

- AMORIM, Lilian; REZENDE, Jorge Alberto Marques; BERGAMIN FILHO, Armando (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 2011. 667 p.
- ALMEIDA, Sheila Matos Viana Soares. **Potencialidade do uso de fungos nematófagos no biocontrole de fitonematóides *Heliconia spp.*** 2008. 45 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual De Santa Cruz, Ilhéus, 2008.
- AMAZONAS, Leonardo (Ed.). **Conjuntura SOJA**. S/c: Conab, 2012. 28 p
- ASMUS, Guilherme Lafourcade. **Danos causados a cultura da soja por nematoides do gênero *Meloidogyne***. Dourados: Embrapa, 2003.
- CARNEIRO, Regina M D Gomes; ALMEIDA, Maria Ritta Alves. Técnicas de eletroforese usadas no estudo de enzimas dos nematoides de galha para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p.35-44, maio 2001.
- COIMBRA, J.L.; GARRIDO, M. da S.; SOUZA, C. da S.; SOARES, A.C.F. Efeito de exsudados de colônias de *Streptomyces* sp. na mobilidade e mortalidade de *Scutellonema bradys*. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v.31, n.2, p. 210-212,2005.
- COOLEN, W.A. & D'HERDE, C.J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. **State Nematology and Entomology Research Station**, Ghent, 1972. 77p.
- COYNE, D.L.; NICOL, J.M.; CLAUDIUS-COLE, B.. **Nematologia prática: Um guia de campo e de laboratório**. Cotonou: S/ed, 2007. 82 p.
- DALL'AGNOL, Amélio; LAZAROTTO, Joelsio José; HIRAKUR, Marcelo Hiroshi. **Desenvolvimento, Mercado e Rentabilidade da Soja Brasileira**. 74. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 20 p. Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/download/CT74\\_eletronica.pdf](http://www.cnpso.embrapa.br/download/CT74_eletronica.pdf)>. Acesso em: 09 nov. 2013.
- FERRAZ, S.; et al. Controle de nematoides com práticas culturais. In: ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado Fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Viçosa: UFV, 2001, p. 1-53.
- FIESP. **Safra Mundial de Soja 2013/14**. São Paulo: Fiesp, 2013. 1 p.
- GUIMARÃES, Thássya Menezes. **MULTIPLICAÇÃO DO NEMATÓIDE MELOIDOGYNE JAVANICA EM PLANTAS INVASORAS E SEU EFEITO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO MANJERICÃO**. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade de Brasília Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária Programa de Pós-graduação em Agronomia, Brasília, 2012.
- GOULART, Alexandre Moura Cintra. **Coleta de amostras para análise de nematoides: recomendações gerais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2009. 26 p.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for extracting nematodes from soil. **Plant Disease Report**, 1964. p. 48, 692.

KIMARI, Hiroshi et al (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças de planta cultivadas**. 2. ed. São Paulo: Ceres, 1997.

LANGE, E. C. Soja, uma história de sucesso. In: BARBIERI, R. L. (Ed.); STUMPF, E. R. T. (Ed.). **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 781-802.

LORDELLO, Luiz Gonzaga E. Contribuição ao conhecimento dos nematoides que causam galhas em raízes de plantas em São Paulo e Estados vizinhos. **Anais Luiz de Queiroz**, São Paulo, v. 21, n. 0, p.01-38, jan. 1964.

MICHEREFF, Sami J. **Fundamentos de Fitopatologia**. I Recife: S/ed, 2001. 133 p.

MORALES, Aguida Maria Rodrigues. **Quantificação relativa da expressão do gene xiloglucana endotransglicosilase em linhagens de soja resistentes e suscetíveis à *Meloidogyne javanica***. 276. ed. Maringá: Embrapa Soja, 2008

NOE, James P.. Nematoides parasitas de plantas. In: TRIGIANO, Roberto N.; WINDHAM, Mark T.; WINDHAM, Alan S. (Ed.). **Fitopatologia**. II Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 8, p. 83-95.

NUNES, Henrique Teixeira. **AGENTES MICROBIANOS NO CONTROLE DE NEMATOIDES E FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DE SOJA E SUA COMPATIBILIDADE COM AGROQUÍMICOS**. 2008. 75 f. Tese (Doutorado) Curso de Microbiologia Agropecuária., Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2008.

PERES, E.; MELO, I.s. De. Variabilidade entre isolados de *Trichoderma harzianum*. I - Aspectos citológicos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, n. , p.56-59, 01 jan. 1995. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sa/v52n1/09.pdf>>. Acesso em: 31 out. 2013.

SANTIN, Rita de Cassia Madail. **Potencial no uso dos fungos *Trichoderma* spp e *Paecilomyces* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Pasheolus vulgaris***. 2008. 91 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SANTOS, Jaime Maia Dos; SOARES, Pedro Luiz Martins; BARBOSA, Bruno Flávio Figueiredo. **Curso de Atualização em Nematologia**. S.l: S/ed, 2013. 143 p. CD-ROM.

SANTOS, Marcilene Almeida Fernandes Dos. **Diversidade de *Meloidogyne incognita* e espécies correlatadas como sugerem abordagens correlatadas morfológicas, biológicas, citológicas e moleculares**. 2012. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012. Cap. 01.

SILVA, João Batista Tavares da; MELLO, Sueli Correa Marquese de. **Utilização de *Trichoderma* no Controle de Fungos Fitopatogênicos: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. 241. ed. Brasília-DF: Embrapa, 2007. 17 p.

SILVA, João Flávio Veloso da et al. **Contribuição ao desenvolvimento de linhagens de soja com resistência a patógenos.** Londrina: Embrapa Soja, 2002. 43 p.

SOARES, Pedro Luiz Martins. **ESTUDO DO CONTROLE BIOLÓGICO DE FITONEMATÓIDES COM FUNGOS NEMATÓFAGOS.** 2006. 252 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” Faculdade De Ciências Agrárias E Veterinárias, Jaboticabal, 2006. Cap. 01.

TORRES, Jorge Braz; MICHEREFF, Sami Jorge (Ed.). **Desafios do manejo integrado de pragas e doenças.** Recife: S/ed, 2000.

VAZ, Madalena Sofia Santos. **Caracterização do gene *lip2* de *Trichoderma harzianum*.** 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 2010.

VIDOR, Caio et al. **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2003: Doença e Medidas de Controle.** Londrina: Embrapa Soja, 2003. 159 p.